

F00

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2002年10月17日(17.10.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/80958 A1

(51) 国际分类号: A61K 38/21, A61P 1/16, 31/12, C12N 15/20, 15/63, 15/70

LTD); 中国北京市海淀区海淀路80号中科大厦16层, Beijing 100080 (CN).

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00128

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(22) 国际申请日: 2002年2月28日(28.02.02)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 01104367.9 2001年2月28日(28.02.01) CN

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 四川省生物工程研究中心(SICHUAN BIOTECHNOLOGY RESEARCH CENTER) [CN/CN]; 中国四川省成都市红星路二段 85 号, Sichuan 610017 (CN).

(72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 魏光文(WEI, Guangwen) [CN/CN]; 郭融冰(GUO, Rongbing) [CN/CN]; 张仁怀(ZHANG, Renhua) [CN/CN]; 中国四川省成都市红星路二段 85 号, Sichuan 610017 (CN).

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: RECOMBINATION SUPER COMPOUND INTERFERON USED AS HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN AND E ANTIGEN INHIBITOR

(54) 发明名称: 重组高效复合干扰素用作乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂

```
5'      11      21      31      41      51
+1 M C D L P Q T N S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGTGATT TACCTCAAC TCATTCTCTT GGTAAACGTC GCGCTCTGAT TCTGCTGCA
TACACACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA CCATTGGCAG CGGAGAGCTA AGAGAGCGT

5'      11      21      31      41      51
+1 Q N R R I S P F S C L K D R H D F G F P
61 CAGATGGGTC GTATTTCGCG GTTAGGTGCG GTGAAGACCG GTCAAGAGCTT CGGCTTTCG
GTCTAGCGAG CATAAAGGG CAATCGAGG GACTTCTCG CAGTGTCTGA GCGAAAGCG

5'      11      21      31      41      51      61      71
+1 Q E E F D G N O F Q K A Q A I S V L H E
121 CAAGAAGAGT TCGATGCGA CCAATTCCAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCAAGAA
GTTCTTCTCA AGCTACCGTT GGTAAAGGTC TTTCAGATCG GTTAGAGACA TGAGTGTCTT

5'      11      21      31      41      51      61      71
+1 M I O O T F N L F S T K D S S A A W O E
181 ATGATCGAAG AGAGCTTCAA CGTGTCTTTC ACTAAGACA GCTCTGCTGC TTGAGAGAA
TACTAGGTTG TGTGGAAGTT GAGCAAAAGG TGATTCTGT GAGAGAGAGS AACCTGCTT

5'      11      21      31      41      51      61      71
+1 S L L E K F Y T E L Y O O L N D L E A G
241 AGCTTGTGCG AGAAGTCTCA CACTGAGTGT TATCAGCAGC TGAAGAGCT GAGAGCAGC
TGAAGAGC TCTTCAGAT GTAGCTTGAG ATAGTGTGCG ACTTGTCTGA CCTTGTAGG

5'      11      21      31      41      51
+1 V I O E V G V E E T P L N V D S I L A
301 GTAATCGAG AAGTGTGTGT AGAAGAGACT CGGCTGATGA AGTGTGAGCT TATTCTGGA
CATTAGTGTG TTCAACGACA TCTTCTCTGA GAGAGACT TGAAGCTGAG ATAGAGCGT
```

(57) Abstract: The present invention relates to the use of recombination super compound interferon (rSIFN-co) as hepatitis B surface antigen and antigen inhibitor, in which the space structure of said interferon protein has been changed.

[见续页]

WO 02/80958 A1

(57) 摘要

本发明涉及改变了蛋白质空间结构的重组高效复合干扰素（Recombinant Super Compound Interferon, rSIFN-co）作为乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂的应用。

重组高效复合干扰素用作乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂

所属技术领域

5 本发明涉及一种通过改变了蛋白质空间结构的重组高效复合干扰素的应用，其特征是它作为一种制剂不仅对乙型肝炎病毒 DNA 有抑制作用，而且对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用。

背景技术

10 重组高效复合干扰素是将几种天然人 α -干扰素亚型中最常见的保守性氨基酸结构用遗传工程的方法建构而成的一种全新干扰素分子，美国专利 4695623、4897471 中对此种干扰素已经有所描述，已证明 rSIFN-co 具有广谱的干扰素活性，有较强的抗病毒和抗肿瘤及天然杀伤细胞活性，美国专利 5372808 公开了用重组高效复合干扰素治疗疾病的方法，中国专利 97193506.8 公开了应用重组高效复合干扰素再次治疗丙型肝炎的方法，中国专利 98114663.5 公开了重组高
15 效复合干扰素的制备方法和治疗乙型肝炎和丙型肝炎的用途。美国食品与药品管理局(FDA)已于 1997 年底批准了美国 Amgen 公司用大肠杆菌生产的 rSIFN-co 用于临床丙肝病人的治疗。

对于乙型肝炎病人的诊断，当检测出表面抗原 (HBsAg) 阳性和 e 抗原 (HBeAg) 阳性者即可判定为乙型肝炎患者，目前临床上采用各种类型的 α -干扰素
20 对慢性乙型肝炎患者进行治疗，其作用机理是：干扰素与细胞表面的特殊膜受体结合而发挥其抗 DNA 和 RNA 的作用。包括对某些酶的诱导作用阻止受病毒感染细胞中病毒的复制。但所有的干扰素均只能抑制病毒 DNA 和 RNA，不能抑制 e 抗原与 s 抗原。

25 发明内容

本发明惊奇地发现改变了蛋白质空间结构的重组高效复合干扰素，作为一种制剂不仅对乙型肝炎病毒 DNA 有抑制作用，而且对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用，从而证明重组高效复合干扰素可以通过抑制乙型肝炎病毒 DNA 和抑制

乙型肝炎 HBsAg 抗原、HBeAg 抗原达到治疗乙型肝炎的目的。

本发明的目的是提供用于治疗乙型肝炎的重组高效复合干扰素药物，通过使用这种药物不仅抑制病毒 DNA，而且抑制乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原，使之降低到正常水平，达到治疗目的。

5 本发明是通过以下方式实现的：

本发明首先通过基因重组技术制备出具有如图 1 序列的重组高效复合干扰素，本发明的重组技术利用大肠杆菌优先表达密码子，在保证氨基酸序列不变的情况下，对其 DNA 编码序列进行了重新设计，然后人工合成其 rSIFN-co 全长的 cDNA 基因。

10 本发明采用重组 DNA 技术将上述 rSIFN-co 全长 cDNA 序列克隆到大肠杆菌高效表达载体中去，然后利用 L-阿拉伯糖诱导/活化表达调控机制激活载体中的强 P_{BAD} 启动子介导下游的 rSIFN-co 基因高效表达。这一阿拉伯糖诱导/活化表达调控系统比通常遗传工程生产中所采用的温控、pH 调控、IPTG 诱导等系统有明显的优点：(1)通常采用的几种调控系统都是以“去阻遏”的形式解除对功能启动子的抑制作用，从而启动子可介导下游基因的表达。改变温度、pH 值本身以及加入 IPTG 诱导物等都对启动子无直接激活作用。在我们采用的系统中，阿拉伯糖与阻遏蛋白 (AraC) 结合后，不仅解除了对 P_{BAD} 启动子的抑制作用，同时“阿拉伯糖-AraC 复合物”又可直接激活 P_{BAD} 启动子介导下游基因的表达。所以阿拉伯糖诱导/活化调控系统是一种比其它几种系统更有效的大肠杆菌高效表达系统；(2) P_{BAD} 启动子活化的程度与加入的 L-阿拉伯糖剂量成线性关系。这样可以直接通过改变阿拉伯糖浓度而调节外源基因产物的表达量。这一特性对改变包涵体的形成等非常有意义。加入阿拉伯糖比改变温度/pH 等更容易直接控制外源基因产物在大肠杆菌中的表达；(3)L-阿拉伯糖来源丰富，价廉、无毒性，这克服其它诱导物如 IPTG 在这方面的缺点。

25 本发明用阿拉伯糖诱导/活化系统建立了高效、稳定的 rSIFN-co 表达大肠杆菌工程菌株，通过对该菌株在适宜的条件下的培养发酵，收获菌体，超声破菌并反复洗涤得包涵体，通过包涵体的变性、复性及分离纯化等工艺，获得了大量高纯度的改变了空间构象的 rSIFN-co 蛋白以用于本发明的研究和临床治疗。

本发明的应用方法是通过患者使用重组高效复合干扰素达到治疗目的，患者使用的重组高效复合干扰素可以制成各种剂型如：片剂、胶囊、口服液、贴剂、注射剂、喷雾剂、栓剂、溶液制剂，推荐的剂型为注射剂，可皮下或静脉注射给药，药物组合物中的载体可使用任何一种适宜的可接受的药物载体，这些载体可以是糖类、纤维素制品、粘合剂、崩解剂、润滑剂、填充剂、增溶剂、缓冲剂、防腐剂、增稠剂、配合剂和其他佐剂。

附图说明

图 1：为 rSIFN-co 的 DNA 编码序列以及推断的氨基酸序列

具体实施方式

本发明通过以下实验验证了改变了空间构象的重组高效复合干扰素对乙型肝炎病毒 DNA，表面抗原和 e 抗原抑制作用，实验方法如下：

材料

溶剂及配制方法：受试药物配制时向每支原料瓶内加入 1ml 生理盐水，溶解后，再根据所设不同剂量组浓度差异用 MEM 培养液调配。现用现配。

对照药品：先灵公司生产的 IFN- α 2b 干扰素为冻干制剂，每支 3×10^6 U 实验时用培养液配成 3×10^6 IU/ml 溶液。安进公司生产的干复津为注射液。每支 9 μ g，0.3ml，相当于 9×10^6 IU/支，实验时用培养液配成 9×10^6 IU/ml 溶液，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，2.2.15 细胞：乙型肝炎病毒(HBV)DNA 克隆转染人肝癌细胞(Hep G2)的 2.2.15 细胞系，美国 Mount Sinai 医学中心构建。

试剂：Eagles MEM 干粉，美国 Gibco 公司产品；胎牛血清，美国 Hyclone Lab 公司产品；G-418(Geneticin)，MEM 配制，美国 Gibco 公司产品；L-谷氨酰胺，京科化学试剂公司进口分装；HBsAg，HBeAg 固相放射免疫测定盒，购自中国同位素公司北方免疫试剂研究所；卡那霉素，华北制药厂产品；Lipofectin，美国 Gibco 公司产品。

实验用品及仪器：培养瓶，丹麦 Tuncclon TM；培养板 96 孔板、24 孔，美国 Corning 公司产品；二氧化碳孵箱，美国 Shel-Lab 产品；

MEM 培养液 100ml: 含胎牛血清 10%, 3%谷氨酰胺 1%, G418 380μg/ml, 卡那霉素 50U/ml。

试验方法

2.2.15 细胞培养: 在长满 2.2.15 细胞的培养瓶内加 0.25%胰酶, 37℃消化 3 分钟, 加培养液吹打, 1:3 传代, 10 天长满。

药物对细胞毒性试验: 实验分无药物细胞对照组和不同药物浓度给药组。细胞消化, 配制成每毫升 10 万个细胞, 接种培养板, 96 孔板每孔 200μl, 37℃ 5%CO₂ 培养 24 小时, 细胞长成单层后进行实验。高效重组高效复合干扰素用培养液配制成 1.8×10^7 IU/ml 溶液, 2 倍稀释加入 96 孔细胞培养板, 每浓度 3 孔, 每 4 天换同浓度药液, 以观察细胞病变为指标, 8 天显微镜下观察细胞病变, 完全破坏为 4; 75%为 3; 50%为 2; 25%为 1; 无病变为 0。计算每浓度药液平均细胞病变程度和抑制%。按 Reed Muench 法计算半数有毒浓度(TC50)和最大无毒浓度 (TC0)。

$$TC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A=log>50%药物浓度 B=log<50%药物浓度 C=log 稀释倍数

对 HBeAg、HBsAg 抑制试验: 试验设 HBeAg、HBsAg 阳性对照组, 阴性对照组, 细胞对照组及不同药物浓度给药组。每毫升 70 万个 2.2.15 细胞接种 6 孔细胞培养板, 每孔 3ml, 37℃5%CO₂ 培养 24 小时, 加无毒浓度以下 3 倍稀释试验药液, 5 个稀释度分别为 4.5×10^6 IU/ml、 1.5×10^6 IU/ml、 0.5×10^6 IU/ml、 0.17×10^6 IU/ml、和 0.056×10^6 , 每浓度 1 孔, 37℃5%CO₂ 培养, 每 4 天换原浓度药液培养, 第 8 天时收获培养液, -20℃冰冻保存。试验重复三批, 分别测定 HBsAg 和 HBeAg。HBsAg 和 HBeAg 测定采用中国同位素公司北方免疫试剂研究所产品, 固相放射免疫测定盒测定, 方法见说明书, 用γ-计数器测定每孔 cpm 值。

药物效果计算: 计算细胞对照及每浓度 cpm 均值及标准差, P/N 值如抑制百分率(%), 半数有效浓度(IC50)及选择指数(SI)。

$$\text{①抗原抑制百分率(\%)} = \frac{\text{细胞对照 cpm} - \text{给药组 cpm}}{\text{细胞对照 cpm}} \times 100$$

②计算药物抑制抗原半数有效浓度 (IC₅₀):

$$IC_{50} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A=log>50% 药物浓度 B=log<50% 药物浓度 C=log 稀释倍数

5 ③改变了空间构象的重组高效复合干扰素在 2.2.15 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的选择指数(SI), 按其对细胞毒性指标细胞病变(SI)计算。

$$SI = \frac{\text{细胞病变毒性 } TC_{50}}{IC_{50}}$$

10

④以 t 检验法计算各稀释度 HBsAg、HBeAg 和对照组间 cpm 的差别。

Southern blot: ①2.2.15 细胞内 HBV——DNA 提取: 2.2.15 细胞加药后培养 8 天, 吸除培养液收取细胞, 加入细胞裂解液, 裂解细胞, 等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇抽提 2 次, 高速 10,000g 离心, 取上清, 加无水乙醇沉淀核酸, 真空抽干, 重溶于 20μl TE 缓冲液中。②电泳: 加入 6X DNA 样品缓冲液, 将样品加于 1.5% 琼脂糖胶上电泳, IV/cm, 恒压, 14-18 小时。③变性、杂交: 将胶分别浸于 HCl、变性液、中和液中。④转膜: 按程序将 DNA 转至 Hybond-N 膜上。同斑点杂交一同进行烤膜、杂交、曝光。扫描仪扫描光片, 以 gel-pro 凝胶分析软件分析相对密度, 计算抑制率及 IC₅₀。

20 统计与分析方法: 各组计量资料结果用算术平均数(x)±标准差(S)表示。根据中国《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》的有关新药药效学研究中统计处理的指导原则, 计数资料用 Fisher 精确检验, 计量资料选择 Student t 检验进行各组均数差异显著性。

结果

25 本发明通过几批实验的结果(见表一、表二、表三)表明: 样品以最大无毒浓度加入 2.2.15 细胞培养 8 天, 高效复合干扰素最大无毒浓度 $9.0 \pm 0 \times 10^6$ IU/ml 对 HBeAg 的平均抑制率为 $46.0 \pm 5.25\%$ ($P < 0.001$), IC₅₀ 为 $4.54 \pm 1.32 \times 10^6$ IU/ml, 选择指数 SI 为 3.96; 对 HBsAg 的平均抑制率为 $44.8 \pm 6.6\%$, IC₅₀ $6.49 \pm 0.42 \times 10^6$ IU/ml, 选择指数 SI 为 2.77。因此, 重组高效

复合干扰素具有明显的抑制乙型肝炎表面抗原和 e 抗原活性，而对照组干扰能和干复津不具有上述活性。临床病例也证实了慢性活动性乙型肝炎患者，通过服用重组高效复合干扰素使乙型肝炎表面抗原和 e 抗原阳性降低或恢复到正常水平。

5 本发明应用的重组高效复合干扰素制剂可通过如下实施例制备：

<实施例一>：冻干注射剂的制备

- | | | |
|----|------------------|--------------|
| | a. 重组高效复合干扰素 | 300 万 IU; |
| | b. 枸橼酸 | 0.2 毫克; |
| | c. 磷酸氢二钠 | 2.5 毫克; |
| 10 | d. 氯化钠 | 4.0 毫克; |
| | e. 右旋糖酐 | 20 毫克; |
| | f. 聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯 | 0.1 毫升; |
| | g. 注射用水 | 适量加至 1.0 毫升。 |

15 制备工艺：按处方称料，用无菌无热原注射水溶解，除菌过滤用 0.22 μ m 孔径滤膜除菌过滤，保存于 8 \pm 2 $^{\circ}$ C，取样作无菌和热原检查合格后分装于西林瓶中，单剂量装每瓶 1.0ml。分装后放置到冻干机中冷冻干燥。

<实施例二>：水溶液注射剂的制备

- | | | |
|----|------------------|--------------|
| | a. 重组高效复合干扰素 | 300 万 IU; |
| | b. 枸橼酸 | 0.2 毫克; |
| 20 | c. 磷酸氢二钠 | 2.5 毫克; |
| | d. 氯化钠 | 4.0 毫克; |
| | e. 右旋糖酐 | 20 毫克; |
| | f. 聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯 | 0.1 毫升; |
| | g. 注射用水 | 适量加至 1.0 毫升。 |

25 制备工艺：按处方称料，用无菌无热原注射水溶解，除菌过滤用 0.22 μ m 孔径滤膜除菌过滤，保存于 8 \pm 2 $^{\circ}$ C，取样作无菌和热原检查合格后分装于密闭容器中。分装于西林瓶中，单剂量装每瓶 1.0ml。分装后成品置 2—10 $^{\circ}$ C 下暗处保存。

表一：测定 rSIFN-co 对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

第一批实验

e 抗原 浓度 (万 IU/ml)	细胞对照			16010			空白			0			稀释倍数		3	IC50	602.74446016
	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加			
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43935	0.345659	0.436227	0.43935	0.345659	0.407079	0.945909	0.592921	0.407079	0.945909	0.592921	0.592921	0.614693546
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.3993754	0.245347	0.369269	0.337997	0.5388299	1.254924	0.337997	0.5388299	1.254924	1.254924	0.300392321
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.386508	0.0005	0.2005	0.195836	0.200833	2.059088	0.195836	0.200833	2.059088	2.059088	0.08867188
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.014991	0	0	0.004997	0.0049969	3.054091	0.004997	0.0049969	3.054091	3.054091	0.001633453
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	0	0	0	0	4.054091	0	0	4.054091	4.054091	0
表面抗原	细胞对照			11714			空白			0			稀释倍数		3	IC50	641.7736749
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加			
900	7706	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.342155	0.381936	0.392693	0.372261	0.922258	0.627739	0.372261	0.922258	0.627739	0.627739	0.595006426
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.2439816	0.336008	0.191053	0.257014	0.5499972	1.370724	0.257014	0.5499972	1.370724	1.370724	0.286349225
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.07649	0.084856	0.118149	0.093165	0.292983	2.27756	0.093165	0.292983	2.27756	2.27756	0.113977019
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.082807	0.051221	0.097661	0.07723	0.1998179	3.20033	0.07723	0.1998179	3.20033	3.20033	0.058767408
11.11111	10672	9352	10810	0.088953	0.201639	0.077173	0.088953	0.201639	0.077173	0.122588	0.122588	4.077742	0.122588	0.122588	4.077742	4.077742	0.02918541

续表一：第二批实验

e 抗原	细胞对照			16962			空白			0			稀释倍数			3		IC50	365.9357846	
浓 度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	1-累加	累加抑制率			
900	7818	8516	9350	0.554378	0.514592	0.467054	0.512008	0.427497	0.371181	0.487992	0.737521972	0.487992	1.371181	0.487992	0.737521972	0.487992	0.737521972			
300	10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.427497	0.3591731	0.8591731	1.060496	0.447563245	1.060496	0.447563245	1.060496	0.447563245	1.060496	0.447563245			
100	12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.244072	0.19201839	0.4316577	1.816423	0.19201839	0.4316577	1.816423	0.19201839	0.4316577	1.816423	0.19201839			
33.33333	15364	17414	16188	0.124259	0.00741	0.77291	0.069653	0.1876045	2.74677	0.063933386	0.063933386	2.74677	0.063933386	2.74677	0.063933386	2.74677	0.063933386			
11.11111	17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	3.628819	0.03148073	0.03148073	0.03148073	3.628819	0.03148073	3.628819	0.03148073	3.628819	0.03148073			
表面抗原	细胞对照			空白			0			稀释倍数			3		IC50	611.0919568				
浓 度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	1-累加	累加抑制率	1-累加	累加抑制率				
900	5784	6198	5792	0.498265	0.462353	0.497571	0.486063	0.893477	0.513937	0.634835847	0.513937	0.634835847	0.513937	0.634835847	0.513937	0.634835847				
300	7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.30598	0.4074138	1.207957	0.252210647	1.207957	0.252210647	1.207957	0.252210647	1.207957	0.252210647				
100	9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.096345	0.101434	2.111612	0.04583464	2.111612	0.04583464	2.111612	0.04583464	2.111612	0.04583464				
33.33333	13942	12368	13478	0	0	0	0	0.0050891	3.111612	0.001632835	3.111612	0.001632835	3.111612	0.001632835	3.111612	0.001632835				
11.11111	12418	11634	11352	0	0	0.015267	0.005089	0.005089	4.106523	0.001237728	4.106523	0.001237728	4.106523	0.001237728	4.106523	0.001237728				

续表一：第三批实验

e 抗原 浓度 (万 IU/ml)	细胞对照			17544			空白			0			稀释倍数		3		IC50		382.0496935	
	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	1-累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.521872	0.428016	0.433204	0.521872	0.461031	0.461031	0.461031	0.461031	0.461031	0.461031	0.461031	0.538969	0.538969	0.709599543	0.709599543
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.40856	0.477066	0.4744723	0.40856	0.477066	0.453366	0.453366	0.453366	0.453366	0.453366	0.453366	0.453366	1.085603	1.085603	0.440859127	0.440859127
100	16312	12688	13934	0.038321	0.251975	0.178517	0.038321	0.251975	0.178517	0.156271	0.156271	0.156271	0.156271	0.156271	0.156271	0.156271	1.929332	1.929332	0.172641621	0.172641621
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.244547	0.216602	0.110954	0.244547	0.216602	0.190701	0.190701	0.190701	0.190701	0.190701	0.190701	0.190701	2.738631	2.738631	0.082519158	0.082519158
11.11111	21928	15366	15728	0	0.094093	0.072751	0	0.094093	0.072751	0.0055615	0.0055615	0.0055615	0.0055615	0.0055615	0.0055615	0.0055615	3.683017	3.683017	0.014875633	0.014875633
表面抗原	细胞对照			11528			空白			0			稀释倍数		3		IC50		694.7027149	
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	平均抑制率	1-累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率
900	5616	6228	5346	0.496864	0.442035	0.521054	0.496864	0.442035	0.521054	0.486651	0.486651	0.486651	0.486651	0.486651	0.486651	0.486651	0.513349	0.513349	0.597838293	0.597838293
300	8542	8590	7096	0.234725	0.230425	0.364272	0.234725	0.230425	0.364272	0.276474	0.276474	0.276474	0.276474	0.276474	0.276474	0.276474	1.236875	1.236875	0.182690031	0.182690031
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.236875	2.236875	0	0
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.236872	3.236872	0	0
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.236875	4.236875	0	0

E 抗原: IC50 均值 450.2434 标准差 132.315479

表面抗原: IC50 均值 649.1894 标准差 42.29580

表二: 干扰能 (IFN- α 2b) 对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

e 抗原	细胞对照			17544			空白			0			稀释倍数		3	IC50	FALSE
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率							
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0.068747	0.068747	0.931253	0.068746724							
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	0	1.931253	0							
33.33333	16760	21716	16400	0	0	0	0	0	2.931253	0							
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	0	3.931253	0							
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	0	4.931253	0							
表面抗原	细胞对照			10886			空白			0			稀释倍数		3	IC50	FALSE
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率							
300	9226	8196	9658	0.152489	0.247106	0.521054	0.1708	0.189295	0.8292	0.185857736							
100	10946	10340	10828	0	0.050156	0.364272	0.018495	0.0184947	1.810705	0.010110817							
33.33333	12250	12980	13934	0	0	0	0	0	2.810705	0							
11.11111	12634	12342	12000	0	0	0	0	0	3.810705	0							
3.703704	10886	10886	10886	0	0	0	0	0	4.810705	0							

表三、干复津对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

第一批实验

e抗原 浓度 (万 IU/ml)	细胞对照			15602			空白			0			稀释倍数		3 IC50		FALSE
	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	1-累加	累加抑制率	
900	14172	12156	17306	0.091655	0.220869	0	0	0.104175	0.306157	0.895825	0.254710274	0.895825	0.254710274	0.895825	0.254710274	0.254710274	FALSE
300	13390	12288	16252	0.1417767	0.212409	0	0	0.118062	0.2019827	1.777764	0.102024519	1.777764	0.102024519	1.777764	0.102024519	0.102024519	FALSE
100	14364	18834	14194	0.079349	0	0.090245	0	0.056531	0.083921	2.721232	0.029916678	2.721232	0.029916678	2.721232	0.029916678	0.029916678	FALSE
33.33333	15722	16034	16340	0	0	0	0	0	0.0273897	3.721232	0.007306592	3.721232	0.007306592	3.721232	0.007306592	0.007306592	FALSE
11.11111	17504	17652	14320	0	0	0.082169	0	0.02739	0.02739	4.693843	0.005801377	4.693843	0.005801377	4.693843	0.005801377	0.005801377	FALSE
表面抗原	细胞对照			11843			空白			0			稀释倍数		3 IC50		FALSE
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加抑制率	1-累加	累加抑制率	
900	12080	11692	12234	0	0.01275	0	0	0.00425	0.025163	0.99575	0.024647111	0.99575	0.024647111	0.99575	0.024647111	0.024647111	FALSE
300	12840	11484	12350	0	0.030313	0	0	0.010104	0.0209125	1.985646	0.010422073	1.985646	0.010422073	1.985646	0.010422073	0.010422073	FALSE
100	12894	14696	15086	0	0	0	0	0	0.010808	2.985646	0.003606955	2.985646	0.003606955	2.985646	0.003606955	0.003606955	FALSE
33.33333	15032	12928	13020	0	0	0	0	0	0.0108081	3.985646	0.002704416	3.985646	0.002704416	3.985646	0.002704416	0.002704416	FALSE
11.11111	11794	11984	11508	0.004137	0	0.028287	0	0.010808	0.010808	4.974837	0.002167838	4.974837	0.002167838	4.974837	0.002167838	0.002167838	FALSE

续表三
第二批实验

e抗原	细胞对照	7848			空白			0			稀释倍数		3 IC50		FALSE	
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	6278	6376	6408	0.200051	0.187564	0.183486	0.190367	0.274635	0.809633	0.253290505	0.274635	0.809633	0.253290505	0.274635	0.809633	0.253290505
300	7692	9092	6394	0.0198777	0	0.18527	0.068383	0.0842678	1.74125	0.046161005	0.0842678	1.74125	0.046161005	0.0842678	1.74125	0.046161005
100	8960	7474	8190	0	0.047655	0	0.015885	0.015885	2.725365	0.005794856	0.015885	2.725365	0.005794856	0.015885	2.725365	0.005794856
33.33333	8530	8144	9682	0	0	0	0	0	3.725365	0	0	3.725365	0	0	3.725365	0
11.11111	7848	7848	7848	0	0	0	0	0	4.725365	0	0	4.725365	0	0	4.725365	0
表面抗原	细胞对照	12828			空白			0			稀释倍数		3 IC50		FALSE	
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加	1-累加	累加抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	12364	12268	12274	0.036171	0.043655	0.043187	0.041004	0.140162	0.958996	0.12751773	0.140162	0.958996	0.12751773	0.140162	0.958996	0.12751773
300	11590	12708	13716	0.0965076	0.009355	0	0.035287	0.0991581	1.923709	0.0490186	0.0991581	1.923709	0.0490186	0.0991581	1.923709	0.0490186
100	12448	13468	13982	0.029623	0	0	0.009874	0.063871	2.913834	0.02144964	0.063871	2.913834	0.02144964	0.063871	2.913834	0.02144964
33.33333	12616	11346	12444	0.016526	0.115529	0.029935	0.053996	0.0539965	3.859838	0.013796309	0.0539965	3.859838	0.013796309	0.0539965	3.859838	0.013796309
11.11111	12828	12828	12828	0	0	0	0	0	4.859838	0	0	4.859838	0	0	4.859838	0

续表三
第三批实验

第三批实验																				
e抗原 浓度 (万 IU/ml)	细胞对照			7740			空白			0			稀释倍数		3		IC50		FALSE	
	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率				
900	7240	6642	6158	0.064599	0.14186	0.204393	0.136951	0.217399	0.863049	0.201211735			0.136951	0.217399	0.863049	0.201211735				
300	11072	8786	6902	0	0	0.108269	0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564			0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564				
100	7016	9726	7552	0.09354	0	0.024289	0.039276	0.044358	2.787683	0.015663017			0.039276	0.044358	2.787683	0.015663017				
33.33333	7622	8866	8676	0.015245	0	0	0.005082	0.0050818	3.782601	0.001341671			0.005082	0.0050818	3.782601	0.001341671				
11.11111	7740	7740	7740	0	0	0	0	0	4.782601	0			0	0	4.782601	0				
表面抗原	细胞对照			11602			空白			0			稀释倍数		3		IC50		FALSE	
浓度 (万 IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	第一抑制率	第二抑制率	第三抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率				
900	11048	11856	11902	0.04775	0	0	0.015917	0.015917	0.015917	0.984083	0.015916796		0.015917	0.015917	0.984083	0.015916796				
300	13454	12896	11798	0	0	0	0	0	0	1.984083	0		0	0	1.984083	0				
100	12846	13160	12546	0	0	0	0	0	0	2.984083	0		0	0	2.984083	0				
33.33333	12680	12458	12360	0	0	0	0	0	0	3.984083	0		0	0	3.984083	0				
11.11111	11602	11602	11602	0	0	0	0	0	0	4.984083	0		0	0	4.984083	0				
e抗原				IC50均值			0 标准差			0 标准差			0 标准差		0 标准差		0 标准差		0 标准差	
表面抗原				IC50均值			0 标准差			0 标准差			0 标准差		0 标准差		0 标准差		0 标准差	

权利要求

1、一种通过改变了蛋白质空间结构的重组高效复合干扰素的应用，其特征是它作为一种制剂不仅对乙型肝炎病毒 DNA 有抑制作用，而且对 HBsAg、
5 HBeAg 均有抑制作用。

2、根据权利要求 1 所述的重组高效复合干扰素的应用，其特征是该制剂是通过一定生产工艺改变了蛋白质空间结构的重组高效复合干扰素，它具有美国专利号 4695623 和 4897471 所描述的干扰素不具备的功效及对其它病毒性疾病，如艾滋病毒等的治疗作用的应用。

10 3、一种权利要求 1 或 2 中所述的重组高效复合干扰素，其特征是具有权利要求 1 或 2 药理作用的蛋白质二级及高级空间结构。

4、一种权利要求 1 或 2 中所述的重组高效复合干扰素，其特征是它含有应用特定的启动子构建的重组高效复合干扰素高效表达系统，包括大肠杆菌、酵母菌及 CHO 表达系统。

15 5、根据权利要求 4 所述的重组高效复合干扰素，其特征是所说的启动子包括 P_{BAD}。

6、根据权利要求 4 所述的重组高效复合干扰素，其特征是其中高效复合干扰素基因是人工合成的 cDNA，且其序列根据宿主密码子偏爱性而作相应调整。

7、一种生产权利要求 1 或 2 中所述的重组高效复合干扰素的生产工艺。

20 8、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是它包括从表达产物中提取重组高效复合干扰素的方法，包括包涵体的制备、变性及复性，所用的层析介质及分离纯化条件，试剂及其浓度等。

9、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是使变性的重组高效复合干扰素恢复其稳定的具有权利要求 1 或 2 所述的药理作用的蛋白质空间结构的方法，包
25 括所用的试剂、试剂的浓度等。

10、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是其中包括分离纯化重组高效复合干扰素的工艺。

11、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是该工艺还包括将高度纯化的重

组高效复合干扰素制成冻干制剂的配方及工艺。

12、根据权利要求 7 所述的工艺，其特征是该工艺还包括将高度纯化的重组高效复合干扰素制成的水溶液制剂的配方及工艺。

13、重组高效复合干扰素制备成抑制乙型肝炎病毒 DNA、HBsAg 及 HBeAg 的药物的应用，权利要求 1 或 2 所指为乙型肝炎，病毒性疾病包括（但不仅限于此）甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、其它除了乙型或者丙型肝炎以外的非甲非乙型肝炎，EB 病毒感染、HIV 感染、疱疹病毒（EB，CML，单纯疱疹病毒）、乳头瘤病毒、痘病毒、微小 RNA 病毒、腺病毒、鼻病毒、人类 T 细胞白血病病毒 I、人类 T 细胞白血病病毒 II 及人类轮状病毒。

14、根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素选自各种 α 、 β 、 γ 型干扰素（如 1a，2b 等）或其它突变体。

15、根据权利要求 13 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素是通过口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻内、粘膜给药等途径给药。

16、根据权利要求 13 所述的应用，其特征是重组高效复合干扰素是通过注射方式药 9 μ g、15 μ g，每周 3 次，疗程 24 周。

1/1

```

5'          11          21          31          41          51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGTGATT TACCTCAAAC TCATTCTCTT GGTAACCGTC GCGCTCTGAT TCTGCTGGCA
TACACACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA CCATTGGCAG CGCGAGACTA AGACGACCGT

5'          71          81          91          1          11
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
61 CAGATGCGTC GTATTTCCC GTTAGCTGC GTGAAAGACC GTCACGACTT CGGCTTTCCG
GTCTACGCAG CATAAAGGGG CAAATCGACG GACTTTCTGG CAGTCTGAA GCCGAAAGGC

5'          31          41          51          61          71
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
121 CAAGAAGAGT TCGATGGCAA CCAATTCCAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCACGAA
GTTCTTCTCA AGCTACCGTT GGTAAAGGTC TTTCGAGTCC GTTAGAGACA TGACGTGCTT

5'          91          1          11          21          31
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAAC AGACCTTGAA CCTGTTTCC ACTAAAGACA GCTCTGCTGC TTGGGACGAA
TACTAGGTTG TCTGGAAGTT GGACAAAAGG TGATTCTGT CGAGACGACG AACCTGCTT

5'          51          61          71          81          91
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
241 AGCTTGCTGG AGAAGTTCTA CACTGAACTG TATCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCATGC
TCGAACGACC TCTCAAGAT GTGACTTGAC ATAGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGTACG

5'          11          21          31          41          51
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
301 GTAATCCAGG AAGTTGGTGT AGAAGAGACT CCGGTGATGA ACGTCGACTC TATTCTGGCA
CATTAGGTGC TTCAACCACA TCTTCTCTGA GCGGACTACT TGCAGGTGAG ATAAGACCGT

```

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷: A61K38/21, A61P1/16, A61P31/12, C12N15/20, C12N15/63, C12N15/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷: A61K38/21, A61P1/16, A61P31/12, C12N15/20, C12N15/63, C12N15/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patents, Chinese Scientific and Technical Journals

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPOQUE, BA, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO9321229(AMGEN INC et al), 28. Oct. 1993 see abstract	1-16
A	WO8304053(AMGEN INC et al), 24. Nov. 1983 see abstract	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23. July, 2002(23. 07. 02)

Date of mailing of the international search report

08 AUG 2002 (08. 08. 02)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

SUN, guangxiu

Telephone No. 86-10-62093884



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN02/00128

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO 9321229	1993-10-28	US5372808	1994-12-13
		EP0641359	1995-03-08
		CN1081909	1994-02-16
		JP7505894T	1995-06-29
WO 8304053	1983-11-24	EP0108128	1984-05-16
		JP59501097T	1984-06-28
		US4897471	1990-01-30

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN02/00128

A. 主题的分类

IPC⁷: A61K38/21, A61P1/16, A61P31/12, C12N15/20, C12N15/63, C12N15/70

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷: A61K38/21, A61P1/16, A61P31/12, C12N15/20, C12N15/63, C12N15/70

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利数据库, 中文科技期刊数据库

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EPOQUE, BA, MEDLINE

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	WO9321229(AMGEN 公司等), 1993 年 10 月 28 日, 见摘要	1-16
A	WO8304053(AMGEN 公司等), 1983 年 11 月 24 日, 见摘要	1-16

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

23. 7 月 2002(23. 07. 02)

国际检索报告邮寄日期

08. 8 月 2002(08. 08. 02)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

授权官员

孙广秀

电话号码: 86-10-62093884



国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00128

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO9321229	1993-10-28	US5372808	1994-12-13
		EP0641359	1995-03-08
		CN1081909	1994-02-16
		JP7505894T	1995-06-29
WO8304053	1983-11-24	EP0108128	1984-05-16
		JP59501097T	1984-06-28
		US4897471	1990-01-30